

深共晶溶媒添加移動相を用いた逆相高速液体クロマトグラフィーにおけるキサンチン系薬剤の保持挙動

日大生産工（院） ○篠部 亮 日大生産工 中釜 達朗

1. まえがき

高速液体クロマトグラフィー（HPLC）は、医薬品や食品など様々な分野で使用されている分離分析法である。水溶性物質を分析対象とする逆相HPLCでは水を主溶媒とした移動相が用いられ、溶出力調整等の理由から移動相にメタノール（MeOH）やアセトニトリル（AN）などの有機溶媒を添加することが多い。しかしながら、共に医薬品外劇物であるために実験者の健康への影響が懸念され、保管や管理が煩雑である。

一方、近年、環境に優しい溶媒として深共晶溶媒（DES）が注目されている。DESは、水素結合受容体（HBA）と水素結合供与体（HBD）による水素結合を形成する2種以上の固体もしくは液体から構成された物質である。各成分単体が室温において固体であっても、得られたDESの共晶点が室温より低い場合、室温以下で液体となる。毒性の少ないHBAやHBDから調製したDESは、実験者に優しい移動相添加溶媒としての可能性を有している。

本発表では、逆相HPLC移動相用添加溶媒として、調製が簡便かつ短時間で可能であり、透明な液体であるグルコース（HBA）とクエン酸（HBD）から構成されるDES（Glc-CA/DES）に着目した。本研究では、Glc-CA/DESを添加した移動相を用いて、気管支拡張薬に使用されるキサンチン系薬剤の逆相HPLCを検討した結果を報告する。

2. 実験

2-1 Glc-CA/DESの調製

Glc-CA/DESは、グルコースとクエン酸をモル比1:1で混合して水を15wt%加えた後、70℃で2時間攪拌することにより調製したり。Fig. 1に原料およびDESの室温における外観を示す。グルコース、クエン酸とも室温では固体である

が、調製したGlc-CA/DESは透明な液体であることがわかる。

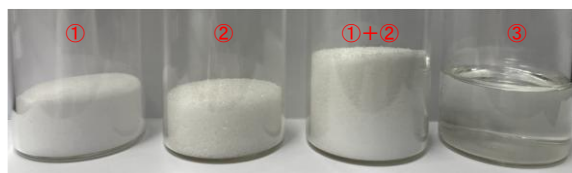


Fig. 1 ①グルコース，②クエン酸および③調製した Glc-CA/DES の外観（室温）

2-2 HPLC条件

実験で用いたHPLC装置は移動相ボトル，HPLC用ポンプ，インジェクター（導入量：5 μ L），オクタデシルシリル（ODS）化シリカゲル充填カラム（内径：4.6 mm，長さ：50 mm），カラム恒温槽および紫外可視分光検出器で構成した。移動相流量は0.50 mL/min，試料導入量は5 μ L，検出波長は240 nmとし，カラム温度は35, 40, 45, 50℃で行った。移動相は①水：AN=97：3（v/v），②水：Glc-CA/DES=97：3（v/v），②' 水：Glc-CA/DES=97：3（w/w），③水：MeOH=97：3（v/v），④水：クエン酸＋グルコース=97：3（w/w），⑤水：クエン酸=97：3（v/v），⑥水：グルコース=97：3（v/v）の7種類を使用した。

測定対象物質は7種のキサンチン系薬剤（グアニン（G），ヒポキサンチン（HX），キサンチン（X），テオブロミン（TB），テオフィリン（TP），ジプロフィリン（DP）およびカフェイン（CF））を選択した。ホールドアップ時間（ t_h ）測定用物質として硝酸ナトリウムを用いた。共に各移動相に溶解させて1 mMになるように調製してHPLC測定に供した。

3. 結果および考察

3-1 カフェインの保持に及ぼす移動相組成の影響

予備検討において、7種の測定対象物質のうち、最も保持時間が長かったカフェインを用いて、7種の移動相をそれぞれ用いたときの保持比較を行った。クロマトグラムをFig. 2に示す。なお、ピーク上の数字は保持係数(k)であり、 $k=(t-t_0)/t_0$ (t : 保持時間, t_0 : ホールドアップ時間) で求められる。

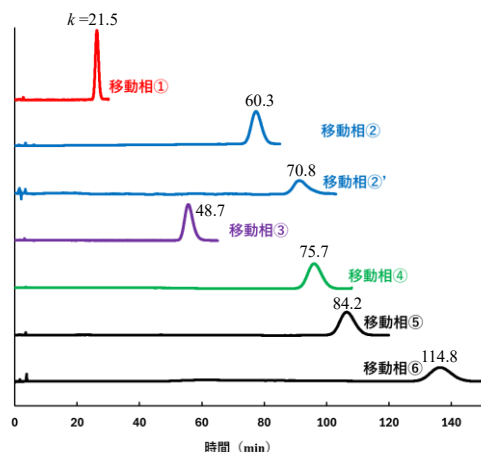


Fig. 2 各移動相におけるカフェインのクロマトグラム (ピーク上の数字は保持係数)

検討の結果、ANを含む移動相①やMeOHを含む移動相③よりもGlc-CA/DESを含む移動相②の方が k は大きかった。DESを構成するグルコースおよびクエン酸をそれぞれ含有する移動相③～⑥はさらに k が大きくなった。この結果から、同体積比で混合した移動相を使用した場合には、カフェインに対してGlc-CA/DESは構成物質であるグルコースあるいはクエン酸と比較して溶出力が高くなったと考えられる。これは、Glc-CA/DES含有移動相ではその構成物質であるグルコースやクエン酸がそれぞれ単独で保持に寄与しているのではなく、DESとして保持に寄与していることを示唆している。

3-2 移動相間での保持係数の相関

G-C/DESを含む移動相②と、ANあるいはMeOHを含む移動相①あるいは③を用いたときの各測定対象物質の k の相関を対数軸としてFig. 3に示す。グアニン(G)を除いた6種のキサンチン系薬剤について、G-C/DES含有移動相とANあるいはMeOH含有移動相は高い相関を得た。この結果は各測定対象物質に対する溶出力が類似していることを示している。

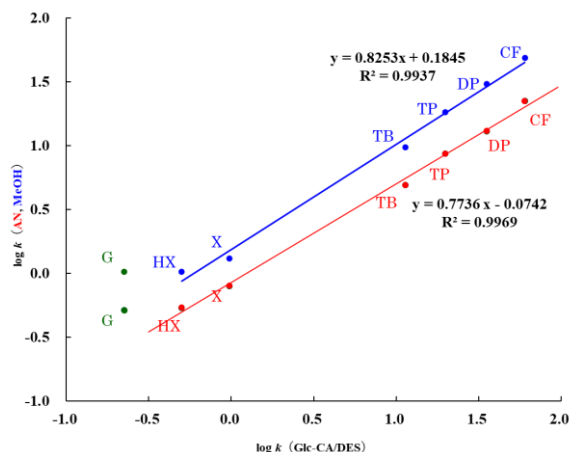


Fig. 3 キサンチン系薬剤の HPLC における Glc-CA/DES 含有移動相と AN (赤) あるいは MeOH (青) 含有移動相との保持係数の相関

3-3 重回帰分析による保持に寄与する相互作用解析

さらに、詳細な考察を行うために論文で公開されている測定対象物質の双極子性や水素結合性などの分子パラメータ²⁾を用いて、移動相①、②および③で得られた k について保持に寄与する相互作用を重回帰分析によって解析した。その結果、各移動相とも疎水性相互作用が強く寄与していることを示唆する結果を得た。しかしながら、他の相互作用を考慮するとGlc-CA/DES含有移動相はAN含有移動相と比較的類似していた。したがって、Glc-CA/DES含有移動相を用いて他のキサンチン系薬剤をHPLC分析する際にはAN含有移動相の分離挙動に類似する可能性があると考えられる。

4. まとめ

グルコース・クエン酸系深共晶溶媒を含む移動相をキサンチン系薬剤の逆相HPLCに使用する場合、アセトニトリル含有移動相の保持や分離挙動に類似することを示唆した。したがって、カラム温度やカラム長さなどを調整することにより、グルコース・クエン酸系深共晶溶媒はアセトニトリルの代替溶媒として使用できる可能性があると考えられる。

参考文献

- 1) M. B. Özmatara, *Rec Agric Food Chem.*, 1.1-2, 12-18, 2021 (2021)
- 2) G. Schuster and W. Linder, *J. Chromatogr. A*, 1273, 73 (2013)